

## 総説 (第30回徳島医学会賞受賞論文)

### トリプルネガティブ乳癌におけるプロテアソーム関連因子PAG1による新規増殖機構の解明

小松正人<sup>1)</sup>, 吉丸哲郎<sup>1)</sup>, 松尾泰佑<sup>1)</sup>, 清谷一馬<sup>1)</sup>, 柳井亜矢子<sup>1,5)</sup>, 斉藤あゆむ<sup>2)</sup>, 山口類<sup>2)</sup>, 尾野雅哉<sup>3)</sup>, 中村祐輔<sup>4)</sup>, 三好康雄<sup>5)</sup>, 宮野悟<sup>2)</sup>, 笹三徳<sup>6)</sup>, 片桐豊雅<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>徳島大学疾患プロテオゲノム研究センター・ゲノム制御分野

<sup>2)</sup>東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センター・DNA情報解析分野

<sup>3)</sup>国立がん研究センター研究所・創薬臨床研究分野

<sup>4)</sup>東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センター・ゲノムシーケンス解析分野

<sup>5)</sup>兵庫医科大学乳腺内分泌外科学

<sup>6)</sup>とくしまプレストケアクリニック

(平成25年5月30日受付) (平成25年6月10日受理)

#### はじめに

乳癌は本邦の女性において最も罹患率が高い固形悪性腫瘍であるが、その中でも免疫組織学的にエストロゲンレセプター・プロゲステロンレセプターおよび上皮成長因子受容体2(HER2/ErbB2)の発現を欠くトリプルネガティブ乳癌 (Triple Negative Breast Cancer: TNBC) は乳癌全体の約15 - 20%を占め、その特徴として病理組織学的に低分化で悪性度が高い傾向にあり、術後早期に再発しやすく、またその生物学的特性から内分泌療法 (抗エストロゲン剤・アロマターゼ阻害剤) や、抗HER2抗体療法 (トラストズマブ) が適応とならず既存の抗癌剤しか選択できないといった臨床上さまざまな問題点がある。そこでわれわれは、TNBCに対する新規分子標的治療薬の創出を目標に、TNBCの遺伝子発現情報に基づいた分子生物学的特性を調べ、その中でプロテアソーム構成因子によるTNBCの増殖制御についての研究を行ってきた。

#### TNBCの遺伝子発現情報の構築

乳癌は非常に不均一性 (heterogeneity) が強い集団であるが、近年のDNAマイクロアレイ技術の発展により、その遺伝子発現情報の相違によって大まかにLuminal-type, HER2-type, basal-typeと分類されるようになった<sup>1)</sup>。その中でも乳腺筋上皮細胞 (myoepithelial cell また

はbasal cell) に特有の遺伝子を高発現するbasal-type乳癌の多くがTNBCの定義を満たすが、TNBC自体も不均一性が強い疾患群であるため、治療戦略を構築するうえで、包括的な生物・生命情報処理解析 (OMICS解析) によりその生物学的特性を正確に捉える必要がある。われわれは、DNAマイクロアレイ解析を通じて正常乳管組織とTNBCのゲノムワイドな遺伝子発現情報を比較することで副作用の少ない分子標的の探索を行った。TNBCと正常乳管組織の遺伝子発現情報を構築する上で、癌組織周囲に混在する組織球や線維芽細胞の遺伝子発現情報の混入が問題となるため、マイクロディセクション法にて癌組織および正常乳管組織を選択的に採取し遺伝子発現情報を構築した (図1)<sup>2)</sup>。その結果、TNBCでは正常乳管と比較して非常に多くの細胞周期を正に制御する遺伝子 (AURKA, TOP2A, CCNE1, CDC6, etc) の発現亢進を認め、一方で細胞外基質や接着に関与する遺伝子 (LAMA3, LTBP2, CHL1, etc) の発現低下を認めた。また、生体の恒常性の維持に重要な4臓器 (心臓・肺・肝臓・腎臓) の遺伝子発現情報とも比較することで、より副作用の少ない新規分子標的候補としてASPMおよびCENPKを同定し、RNA干渉法によるASPMおよびCENPKの発現抑制が、効果的にTNBCの増殖抑制を誘導することも確認した<sup>2)</sup>。さらにわれわれは、構築した遺伝子発現情報を用いてTNBCと正常乳管組織の間でどのような遺伝子セット (パスウェイ) に変動を認めるかということをMeta-Gene解析を用いて検証した。

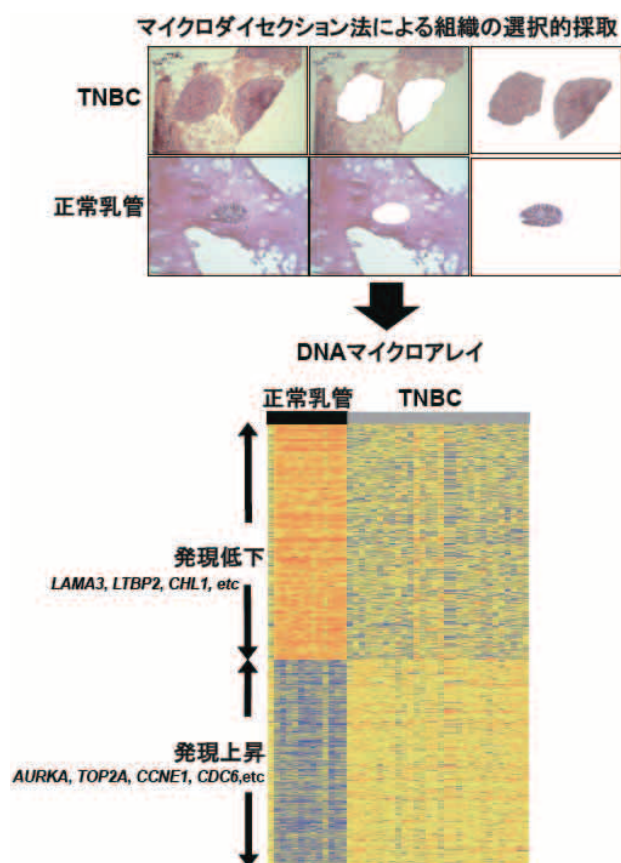


図1 マイクロダイセクション法による組織の選択的採取およびDNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現情報の構築（文献2より）

## Meta-Gene 解析

Meta-Gene 解析は、DNA マイクロアレイ解析により TNBC と正常乳管との間で有意に発現変動を認めた遺伝子を既存の遺伝子セットに統合し、得られた統計量（Z-score）によりどのような遺伝子セットが最も2群間で変動しているかを探索する *in silico* 解析である<sup>3,4)</sup>。その結果、TNBC と正常乳管組織の間では E2F network や cyclosome regulation といった細胞周期に関連する遺伝子セットが大きく変動し、興味深いことにそれら変動している遺伝子セットに共通して、種々のプロテアソーム関連因子（19S/26S プロテアソーム構成因子）が TNBC において高発現していることを見出した（図2）。すなわち、癌細胞において細胞周期の driving force としてプロテアソーム関連因子が深く関わっており、未だはっきりとした増殖機構が解明されていない TNBC において、新規な増殖制御因子の一つとなり得ると考えられた。

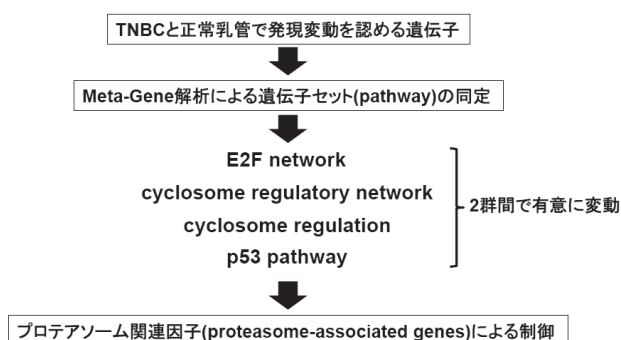


図2 Meta-Gene 解析による変動遺伝子セットの同定とプロテアソームによる遺伝子セットの機能制御

## TNBC におけるプロテアソーム構成因子の増殖に与える役割

前述のように、プロテアソーム関連因子と TNBC の増殖が密接な関係にあることが同定できたことにより、われわれは TNBC 細胞株（MDA-MB-231および HCC1937 細胞）に対し、RNA 干渉法を用いていくつかのプロテアソーム関連因子の発現抑制を施行した。その結果、細胞増殖の抑制および26S プロテアソームの触媒活性の低下、同時に p21<sup>waf1</sup>や p27<sup>kip1</sup>といった細胞周期を負に制御する因子の蓄積を確認することができた。従って、これら TNBC で発現上昇を認めるプロテアソーム関連因子の発現抑制は、TNBC 細胞株の26S プロテアソームの蛋白触媒活性を低下させることにより、26S プロテアソームの標的である p21<sup>5)</sup>や p27<sup>6)</sup>といった癌抑制因子である cyclin-dependent kinase inhibitors を安定化させ、効果的に癌細胞の増殖抑制を誘導できるものと考えられた。

## プロテアソーム関連因子の細胞内局在

前項で述べたように、TNBC に対し種々のプロテアソーム関連因子が有効な分子標的となりうることが示唆されたが、その中の一つである PAG1（proteasome-associated gene 1）に対する特異抗体を用いて、100例の TNBC の切除標本に対し免疫組織染色を施行したところ、高発現症例は有意に全生存期間の短縮を認めた。興味深いことに、PAG1は癌細胞の核・細胞質の両方に染色されるが、その中でも核染色が高度な症例は無再発生存期間および全生存期間ともに大幅に短縮している結果であった。培養細胞系においては、血清飢餓状態に曝した MDA-MB-231細胞の PAG1は細胞質のみに局在し、一方で血清を添加することにより再び PAG1は核に局在し、これは増殖マーカーである ki67（MKI67）の発現パターンとも一致していた。すなわち細胞周期に entry した増殖が活発な癌細胞において、核内の PAG1がその

増殖制御に極めて重要な役割を担っているものと考えられ、同時に PAG1 の核濃染が TNBC における新たな予後予測マーカーになりうると考えられた。

# TNBC におけるプロテアソーム関連因子 PAG1 の 26S プロテアソーム非依存的な増殖制御機構

ヒト ES 細胞を用いた研究により、19S プロテアソームの構成因子の non-ATPase サブユニットである PSMD11 がプロテアソームのキモトリプシン様活性を上昇させることが知られているが<sup>37)</sup>、われわれが同定した PAG1 を HEK293 細胞に過剰発現させても、プロテアソーム活性は全く変化せず、一方で NIH3T3 細胞の増殖を有意に上昇させたことから、PAG1 の過剰発現および核局在による細胞増殖制御機構はプロテアソームの活性とは全く独立していることが示唆された。そこでわれわれは、核内 PAG1 の細胞増殖制御機構を解明するために、核内 PAG1 と相互作用する分子を MDA-MB-231 細胞の核抽出物の抗 PAG1 抗体による免疫沈降産物を用いて、2DICAL (2-Dimensional Image Converted Analysis of LC/MS) という方法で探索した。この方法は、細胞溶解液または免疫沈降産物等に含まれる蛋白をトリプシンで断片化し、すべてのペプチド断片を網羅的にシークエンス解析する手法である<sup>8,9)</sup>。その結果、転写因子 ZNF844 や DNA 修復に関連する INO80 複合体<sup>10)</sup> の構成因子である ARP5 (actin related protein 5) が同定され、興味深いことに、これらの分子はプロテアソームの形成に必要なシャペロン分子の一つであることが報告されている p28 (Gankyrin)<sup>11)</sup> の発現抑制により、成熟プロテアソームの形成を阻害した場合においても、強固に PAG1 と結合していたことにより、プロテアソームとは独立して PAG1 と核内にて転写複合体を形成、あるいは DNA 修復に関与して TNBC の増殖を正に制御している可能性が示唆された (図 3)。

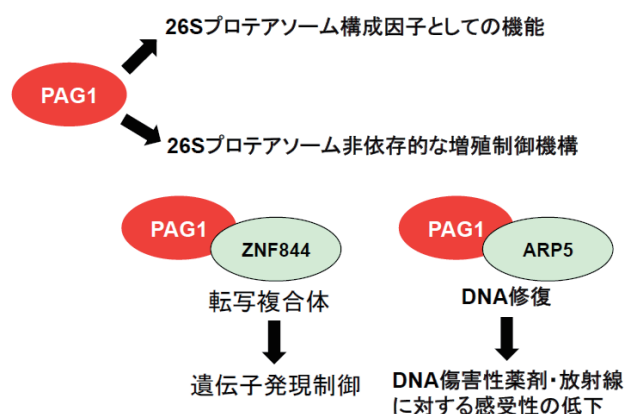


図3 PAG1の二面的な増殖制御機構

## おわりに

本研究の網羅的遺伝子発現情報解析により、TNBC の新たな増殖制御機構として、プロテアソーム関連因子 PAG1 を含めた 26S プロテアソームの触媒活性を介した細胞周期の駆動制御と、一方で PAG1 の核における 26S プロテアソーム非依存的な増殖制御機構が存在することが明らかとなった。前者に対しては、現在多発性骨髄腫で臨床応用されているプロテアソーム阻害剤 Bortezomib の効果が期待されるが、後者の 26S プロテアソーム非依存的な増殖制御機構に対しては Bortezomib は無効であると推察される。今後 PAG1 とその相互作用因子の核における共局在の生物学的意義と局在制御機構の解明、およびその相互作用を阻害するような小分子化合物などの探索が、未だ治療選択肢の少ない TNBC に対し新たな治療法を提供できるものと考えている。

## 謝 意

本研究において、御指導・御鞭撻を賜りました徳島大学疾患プロテオゲノムセンター・ゲノム制御分野の片桐豊雅教授ならびに教室の諸先生方、また共同研究者の諸先生方に心から感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) Perou, C. M., Sørbye, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., *et al.*: Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406 (6797): 747-752, 2000
- 2) Komatsu, M., Yoshimaru, T., Matsuo, T., Kiyotani, K., *et al.*: Molecular features of triple negative breast cancer cells by genome-wide gene expression profiling analysis. *Int. J. Oncol.*, 42 (2): 478-506, 2013
- 3) Yamaguchi, R., Yamamoto, M., Imoto, S., Nagasaki, M., *et al.*: Identification of activated transcription factors from microarray gene expression data of Kampo medicine-treated mice. *Genome Inform.*, 18: 119-29, 2007
- 4) Yoko, Watanabe-Fukuda, Masahiro, Y., Naoko, M., Masato, F., *et al.*: Oreganodokuto and berberine improve indomethacin-induced small intestinal injury via adenosine. *J. Gastroenterol.*, 44: 380-389, 2009
- 5) Bloom, J., Amador, V., Bartolini, F., DeMartino, G., *et al.*: Proteasome-mediated degradation of p21 via N-terminal ubiquitinylation. *Cell*, 115: 71-82, 2003
- 6) DeSalle, L. M., Pagano, M.: Regulation of the G1 to S transition by the ubiquitin pathway. *FEBS Lett.*, 490 (3): 179-89, 2001

- 7) Vilchez, D., Boyer, L., Morantte, I., Lutz, M., *et al.* : Increased proteasome activity in human embryonic stem cells is regulated by PSMD11. *Nature*, **489** (7415) : 304-308, 2012
- 8) Ono, M., Honda, K., Isobe, T., Kuwabara, H., *et al.* : Label-free quantitative proteomics using large peptide data sets generated by nanoflow liquid chromatography and mass spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics*, **5**(7) : 1338-47, 2006
- 9) Ono, M., Matsubara, J., Honda, K., Sakuma, T., *et al.* : Prolyl 4-hydroxylation of alpha-fibrinogen : a novel protein modification revealed by plasma proteomics. *J. Biol. Chem.*, **284**(42) : 29041-9, 2009
- 10) Morrison, A. J., Shen, X. : Chromatin remodelling beyond transcription : the INO80 and SWR1 complexes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **10**(6) : 373-84, 2009
- 11) Kaneko, T., Hamazaki, J., Iemura, S., Sasaki, K., *et al.* : Assembly pathway of the Mammalian proteasome base subcomplex is mediated by multiple specific chaperones. *Cell*, **137**(5) : 914-25, 2009

## *Involvement of proteasome-associated gene 1 in proliferation of triple negative breast cancer*

Masato Komatsu<sup>1)</sup>, Tetsuro Yoshimaru<sup>1)</sup>, Taisuke Matsuo<sup>1)</sup>, Kazuma Kiyotani<sup>1)</sup>, Ayako Yanai<sup>1,5)</sup>, Ayumu Saito<sup>2)</sup>, Rui Yamaguchi<sup>2)</sup>, Masaya Ono<sup>3)</sup>, Yusuke Nakamura<sup>4)</sup>, Yasuo Miyoshi<sup>5)</sup>, Satoru Miyano<sup>2)</sup>, Mitsunori Sasa<sup>6)</sup>, and Toyomasa Katagiri<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Division of Genome Medicine, Institute for Genome Research, University of Tokushima, Japan

<sup>2)</sup>Laboratory of DNA information analysis, Human Genome Center, Institute of Medical Science, University of Tokyo, Japan

<sup>3)</sup>Chemotherapy Division and Cancer Proteomics Project, National Cancer Center Research Institute, Tokyo, Japan

<sup>4)</sup>Molecular Medicine, Human Genome Center, Institute of Medical Science, University of Tokyo, Japan

<sup>5)</sup>Department of Surgery, Division of Breast and Endocrine Surgery, Hyogo College of Medicine, Hyogo, Japan

<sup>6)</sup>Tokushima Breast Care Clinic, Tokushima, Japan

## SUMMARY

Triple negative breast cancer (TNBC) is considered to be one of the most aggressive subtypes of all breast cancers. To identify novel potential therapeutic targets and clarify pathophysiological features for TNBC, we conducted Meta-gene profiling analysis based on gene-expression profiling of TNBC cases purified by lasermicrobeam microdissection, and found that proteasome-associated genes (PAGs) were commonly upregulated in various pathways including cell cycle regulation in TNBC. Depletion of PAGs with RNAi caused the upregulation of p27 and p21 proteins in MDA-MB-231 and HCC1937 cells, respectively, resulting in growth inhibition. Interestingly, immunocytochemical staining revealed that PAG1 was observed in the nucleoli and/or cytoplasm (n-PAG1 and c-PAG1) in TNBC cell line and clinical specimens. Immunohistochemical staining of 100 TNBCs showed that high level of n-PAG1 was significantly associated with poor disease free and overall survival of TNBC patients. These results indicate that n-PAG1 plays a critical role in nucleus during cell cycle progression and might be a novel prognostic indicator or an attractive molecular target of TNBC.

Key words : Triple Negative Breast Cancer, gene-expression profiling, proteasome-associated-genes